

Ein spontan aus dem Blutserum kristallisierendes 7 S Immunglobulin

Von W. PALM

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Universität Graz (Vorstand: Prof. Dr. A. Holasek)

(Eingegangen am 6. November 1967)

Es wird ein Kryoprotein beschrieben, welches durch sein spontanes Auskristallisieren aus dem Blutserum ausgezeichnet ist. Durch Papier-electrophorese, Immuno-electrophorese und Geldiffusion sowie durch Sedimentations- und Diffusionsmessungen konnte es als ein 7 S Immunglobulin identifiziert werden. Nach reduktiver Spaltung zeigten die Bruchstücke in der Stärkegelelektrophorese kein einheitliches Verhalten. Die immunologische Aktivität dieser Bruchstücke wurde überprüft.

A cryoprotein is described, which is characterised by its spontaneous crystallisation from blood serum. It was identified as a 7 S immunoglobulin by paper electrophoresis, immunoelectrophoresis and gel diffusion, and by sedimentation and diffusion measurements. The products of reductive cleavage do not behave uniformly in starch gel electrophoresis. The immunological activity of these cleavage products was examined.

Die beim Abkühlen des Serums ausfallenden Kryoglobuline bilden überwiegend amorphe Niederschläge (1—5). In seltenen Fällen läßt sich das als Niederschlag isolierte Protein kristallisieren. Zu den größten Seltenheiten gehören jedoch Kryoproteine, die schon beim Abkühlen des Serums auf Zimmertemperatur *spontan* als rein kristalliner Niederschlag erscheinen (6—10).

Unter den Kryoproteinen sind bisher mehrere 7 S Immunglobuline beschrieben worden (3, 6, 7, 9). Die Untersuchung dieser 7 S Globuline, von denen man aufgrund der Kristallisierbarkeit annehmen kann, daß sie einheitlich sind, könnte wertvolle Ergebnisse zum Verständnis der immunologischen Reaktion liefern. Das zu beschreibende Kryoglobulin war nicht nur sehr leicht isolierbar, sondern stand auch in ausreichender Menge zur Verfügung, so daß es näher untersucht werden konnte.

Isolierung und Eigenschaften

Das Blutserum eines 63jährigen, männlichen Patienten zeigte bereits bei Raumtemperatur einen Niederschlag, der sich beim Abkühlen des Serums auf 4° stark vermehrte. Bei mikroskopischer Untersuchung ergab sich, daß der Niederschlag nur aus nadelförmigen Kristallen bestand (Abb. 1).

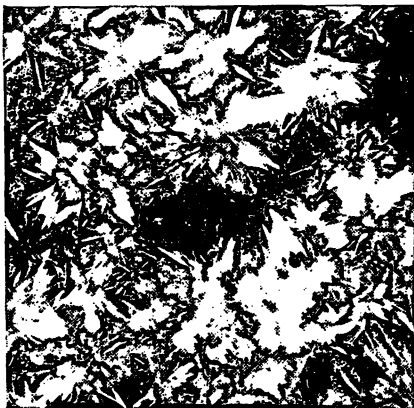


Abb. 1
Kryoproteinkristalle im Serum
(Mikrophotographie, in polarisiertem Licht aufgenommen)

Die *Isolierung* des Niederschlages aus dem Serum erfolgte durch Abzentrifugieren in einer gekühlten Laborzentrifuge. Um anhaftende Serumbestandteile zu ent-

fernen, wurde der Niederschlag dreimal mit eisgekühltem dest. Wasser gewaschen.

Zur *Umkristallisation* wurde der Kristallbrei in 0,15M Natriumchlorid gelöst und darauf in einem Dialysierschlauch gegen dest. Wasser bis zur beendeten Kristallisation im Kühlraum dialysiert. Die Dauer dieses Vorganges war vom jeweiligen Reinheitsgrad der Kristallisation abhängig. Nach öfterem Auflösen in 0,15M Natriumchlorid konnte nämlich eine zunehmende Löslichkeit in dest. Wasser bzw. salzärmer Lösung festgestellt werden (1). Dann bildeten sich Kristalle nur über eine amorphe Form, wozu mehrere Tage, manchmal auch Wochen, notwendig waren.

Das schon durch einfache qualitative Reaktionen (Fällung, Biuret) sicher als Eiweiß identifizierte Material wurde der *Papierelektrophorese* (Elektrophoresekammer der Fa. LKB, 110 V, 14 Stdn., Michaelispuffer pH 8,6, $\mu = 0,1$) unterworfen und befand sich, verglichen mit dem Vollserum des Patienten, zwischen dem β_2 - und γ -Globulinbereich.

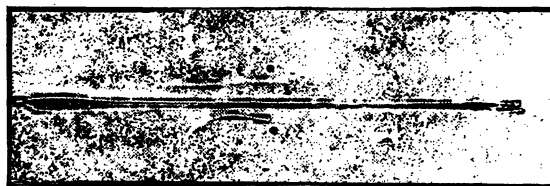


Abb. 2
Immuno-electrophorese
oben: normales 7 S Immunglobulin
unten: Kryoglobulin

Die *Immuno-electrophorese* (11) wurde im Mikroverfahren durchgeführt. Die Abbildung 2 zeigt oben isoliertes, normales 7 S Immunglobulin, unten isoliertes Kryoprotein nach elektrophoretischer Auftrennung und Präzipitation durch ein Antihuman- γ -Globulinserum, welches in die gemeinsame Mittelspalte eingebracht worden war. Aus Abbildung 2 ist beim Kryoglobulin eine deutliche Verkürzung der Präzipitationslinie gegenüber der des normalen γ -Globulins zu erkennen.

Auch mit Hilfe der *Geldiffusion* (12) konnte die Reinheit des isolierten Proteins überprüft und die immunologische Verwandtschaft mit normalem Human- γ -Globulin bewiesen werden.

Die *Sedimentationsversuche* wurden in analytischen Ultrazentrifugen (Fa. Phywe, Typ U 50 L bzw. Fa. Beckman, Model E) durchgeführt. Hierbei konnte bei höheren Proteinkonzentrationen gelegentlich eine geringe Menge einer schnell sedimentierenden Fraktion beobachtet werden, die sowohl im Vollserum (zwischen den 7 S- und 19 S Komponenten) als auch in Lösungen des isolierten Proteins auftrat. Da es sich hierbei vermutlich um Aggregationen handelte, wurden Bedingungen gesucht, um die Bildung dieser Aggregate zu verhindern. Zu diesem Zweck wurden etwa 3proz. Lösungen des Proteins in 0,10M primärem Natriumphosphat (pH 4,8), in 0,15M Natriumchlorid (pH neutral) und in 0,10M Natriumtetraborat (pH 9,2) 48 Std. bei 37° stehen gelassen. Danach war nur die Lösung im Natriumtetraborat klargeblieben; in den beiden anderen Lösungen war eine Niederschlagsbildung zu beobachten.

Die anschließende Untersuchung dieser Lösung in der analytischen Ultrazentrifuge zeigte, daß die Neigung zur Aggregatbildung in 0,10M primärem Natriumphosphat größer war als in 0,15M Natriumchlorid. In 0,10M Natriumtetraborat konnte keine Sedimentation aggregierter Partikel beobachtet werden. Die hohe Eiweißkonzentration (3%) wurde gewählt, um auch Spuren von Aggregatbildungen leichter nachzuweisen. Die Sedimentationskonstante, berechnet aus 12 Läufen zwischen den Konzentrationen 0,32% und 1,62%, ergab, auf die Konzentration null extrapoliert, einen Wert von 7,1 Svedberg-Einheiten (7 S Immunglobulin 6,6–7,2). Die *Diffusionsmessungen* (Meßeinrichtung an die Ultrazentrifuge Phywe U 50 L angeschlossen) ergaben aus 7 Bestimmungen zwischen den Konzentrationen 0,35% und 1,35% eine auf die Konzentration null extrapolierte Diffusionskonstante von $D_{20} = 3,8 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{Sek.}$ (7 S Immunglobulin Werte bis 4,0).

Die *Konzentrationsbestimmungen* der Proteinlösungen basierten auf UV-Messungen bei 280 nm unter Zugrundelegung der bei einem normalen 7 S Immunglobulin gefundenen UV-Absorption ($E/\text{mg}/\text{ml}$). Zur Berechnung des *Molekulargewichtes* wurden die Werte aus Sedimentation und Diffusion in die Formel von Svedberg (13) eingesetzt. Es errechnete sich daraus ein Molekulargewicht von 178000.

Reduktive Spaltung

Die mit Mercapto-äthanol durchgeführte reduktive Spaltung der Disulfidbrücken (14) bei normalem Human- γ -Globulin ergibt zwei Arten von Bruchstücken, welche wiederum mittels Stärkegelelektrophorese jeweils in mehrere Komponenten aufgetrennt werden können (15). Die Fähigkeit des vorliegenden Proteins zur Kristallisation ließ die Vermutung zu, daß es einheitlich ist und daß auch die bei der reduktiven Spaltung entstehenden beiden Bruchstücke elektrophoretisch einheitlich erscheinen.

Abbildung 3 zeigt das Ergebnis der säulenchromatographischen Auftrennung der Bruchstücke des Kryoglobulins und der des normalen Human- γ -Globulins nach der reduktiven Spaltung.

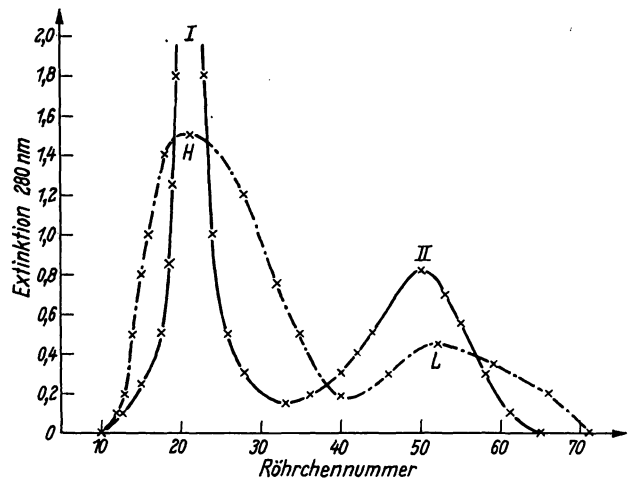


Abb. 3

Säulenchromatographische Trennung der Bruchstücke
 - - - - -: reduziertes Human- γ -Globulin
 —————: reduziertes Kryoglobulin

Die Bruchstücke I und II des Kryoglobulins, entsprechend den Bruchstücken H und L des normalen Human- γ -Globulins, wurden nun der *Stärkegelelektrophorese* unterworfen. Bei Einheitlichkeit des Proteins wäre hierbei ein Minimum an Banden zu erwarten. Es konnte jedoch festgestellt werden, daß beide Bruchstücke aus mehreren Komponenten bestehen.

Um die *immunologisch aktiven Stellen* („antibody combining sites“) an den Bruchstücken I und II zu untersuchen, wurden diese dem Geldiffusionstest (12) gegen Antihuman- γ -Globulin bei verschiedenen Verdünnungen unterworfen (Abb. 4a); im Vergleich dazu ist das Ergebnis der Geldiffusion der Bruchstücke H und L des normalen Human- γ -Globulins dargestellt (Abb. 4b).

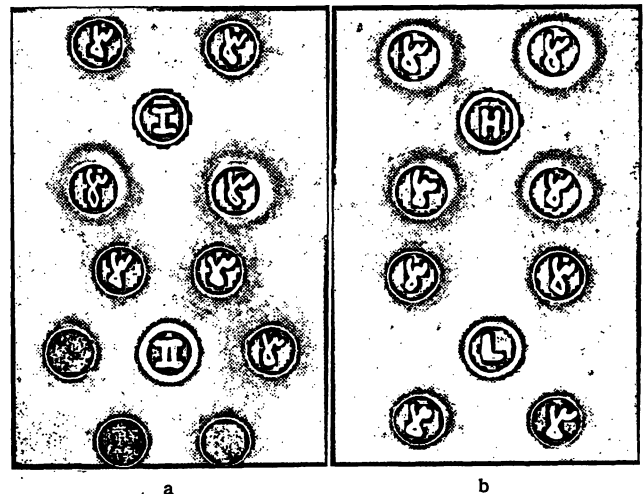


Abb. 4a

Geldiffusion der Bruchstücke I und II des reduzierten Kryoglobulins

Abb. 4b

Geldiffusion der Bruchstücke H und L des normalen reduzierten Human- γ -Globulins

Aus den Abbildungen ist zu erkennen, daß nach den hier durchgeführten Versuchen beim Kryoglobulin der Hauptteil der immunologischen Aktivität im Bruchstück II zu liegen scheint (Abb. 4a), während beim Human- γ -Globulin das Bruchstück H den größten Teil immunologisch aktiver Stellen (14) trägt (Abb. 4b).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß sich das beschriebene Kryoglobulin kaum von einem normalen 7 S Immunglobulin unterscheidet. In der Immunoelktrophorese bildet es eine bedeutend kürzere Präzipitationslinie, was auf Einheitlichkeit schließen läßt. Sein Molekulargewicht ist etwas höher als das der normalen 7 S Immunglobuline. Diese Differenz dürfte auf kleinen Mengen von Polymeren beruhen, die im Sedimentationsversuch nur zu einer Verschiebung der Werte und nicht zur Ausbildung eines eigenen Gradienten führen.

Der einzige augenscheinliche Unterschied war bei der Untersuchung der antigenwirksamen Stellen der Bruchstücke zu erkennen: während beim normalen γ -Globulin die H-Kette als Antigenträger wirksamer ist, findet man beim Kryoprotein stärkere Wirksamkeit in der II-Kette, die der L-Kette entspricht. Daß die Stärkegelelektrophorese der Bruchstücke des Kryoproteins keine Einheitlichkeit ergibt, mag vielleicht daran liegen, daß die Bruchstücke zur Aggregation neigen.

Dem Österreichischen Forschungsrat, der uns eine analytische Ultrazentrifuge zur Verfügung gestellt hat, sei auf diesem Wege aufrichtiger Dank ausgesprochen.

Literatur

1. LERNER, A. B. und G. R. GREENBERG, J. biol. Chemistry 162, 429 (1946). — 2. ABRAMS, A., P. P. COHEN und O. O. MEYER, J. biol. Chemistry 181, 237 (1949). — 3. BARR, D. P., G. G. READER und C. H. WHEELER, Ann. Int. Med. 32, 6 (1950). — 4. MANDEMA, E. und P. C. SCHAAF, J. Laborat. Clin. Med. S. Louis 45, 261 (1955). — 5. MACKAY, J. R., N. ERIKSEN und N. G. MOTULSKY, Amer. J. Med. XX, 564 (1956). — 6. BONSDORF, B. v., H. GROTH und T. PACKALEN, Folia hämat. 59, 184 (1938). — 7. HOLMBERG, G. und A. GRÖNWALL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 273, 199 (1942). — 8. BLADES, A. N., Brit. Med. J. 4699, 169 (1951). — 9. OLHAGEN, B., Acta med. Scand. 138, 86 (1956). — 10. CAPUTO, A. und E. APPELLA, Arch. Biochem. Biophysics 91, 201 (1960). — 11. GRABER, P. und P. BURTIN, Immunoelkttrische Analyse, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, New York (1964). — 12. OUCHTERLONY, Ö., Progr. Allergy 5, 1 (1958). — 13. SVEDBERG, T. und K. O. PEDERSEN, The Ultrazentrifuge, Oxford at the Clarendon Press (1940). — 14. FLEISCHMANN, J. B., R. H. PAIN und R. R. PORTER, Arch. Biochem. Biophysics Suppl. 1, 174 (1962). — 15. EDELMAN, G. M. and M. D. POULIK, J. Exper. Med. 113, 861 (1961).

Dr. W. Palm
Universitätsplatz 2
A 8010 Graz

Die gleichzeitige Bestimmung der Sekretionsrate von Cortisol und Corticosteron beim Menschen

Von L. RAITH und H. J. KARL

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. H. Schwiege)

(Eingegangen am 6. November 1967)

Nach dem Isotopenverdünnungsprinzip wurden nach i. v. Injektion von $2 \mu\text{C } ^3\text{H}$ -Cortisol und $0,2 \mu\text{C } ^{14}\text{C}$ -Corticosteron gleichzeitig die Sekretionsraten dieser beiden Steroide beim Menschen bestimmt. Tetrahydrocortisol, ein Metabolit von Cortisol und Tetrahydrocorticosteron, ein Metabolit von Corticosteron wurden aus Urin nach Hydrolyse mit β -Glucuronidase, Extraktion mit Methylenchlorid und Papierchromatographie in den Systemen Bush C, B/50 und LT 21/85 separiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung der Papiereluat wurden Tetrahydrocortisol und Tetrahydrocorticosteron quantitativ mit Tetrazoliumblau-Reagenz bestimmt, die ^3H - und ^{14}C -Impulse dieser Metaboliten gezählt und aus deren spezifischer Aktivität die Sekretionsraten von Cortisol und Corticosteron berechnet. Bei 12 Gesunden betrug die Cortisolsekretion 10,5 mg bis 20,0 mg/Tag und die Corticosteronsekretion 2,3 mg bis 4,2 mg/Tag.

After the i. v. application of $2,0 \mu\text{C } ^3\text{H}$ -cortisol and $0,2 \mu\text{C } ^{14}\text{C}$ -corticosterone the secretion rates of these steroids were measured with aid of the isotope dilution technique. Tetrahydrocortisol, a metabolite of cortisol, and tetrahydrocorticosterone, a metabolite of corticosterone, were separated from urine after hydrolysis with β -glucuronidase, extraction with methylene chloride and paper chromatography in the systems Bush C, B/50 and LT 21/85. The hormones were eluted from the paper and further purified by column chromatography. Tetrahydrocortisol and tetrahydrocorticosterone were then estimated quantitatively with tetrazolium blue reagent and the ^3H - and ^{14}C -impulses of the metabolites were counted. From the specific activity of tetrahydrocortisol and tetrahydrocorticosterone the secretion rates of cortisol and corticosterone were calculated. In 12 normal persons the secretion rate of cortisol was 10,5 mg—20,0 mg/day and the secretion rate of corticosterone 2,3 mg—4,2 mg/day.

Die Sekretionsrate eines Nebennierenrindenhormons kann nach dem Isotopenverdünnungsprinzip bestimmt werden (1, 2). Bei dieser Methode wird nach Applikation eines radioaktiv markierten Corticosteroids die von der Nebennierenrinde in der Zeiteinheit sezernierte bzw. die vom Organismus metabolisierte Hormonmenge aus der spezifischen Aktivität eines aus dem

Urin isolierten Metaboliten dieses Steroids berechnet. Unter den Bedingungen, die von LAUMAS und TART (3, 4) ausführlich diskutiert wurden, ist diese Methode zuverlässig und genau. Sie hat sich bei der Bestimmung der Sekretionsrate von Cortisol (1, 5), von Corticosteron (6, 7) und von Aldosteron (2, 8) bewährt. FLOOD und Mitarbeiter (2) haben erstmals